STŒCKLIN, E. DE

Contribution à l'étude de la peroxydase, par E. de Stœcklin.

1907

QK
898
P47
1907
Bot.

UNIVERSITE DE GENÈVE — INSTITUT DE BOTANIQUE
Prof. Dr R. CHODAT. — 7me Série. — VIIme Fascicule.

CONTRIBUTION

A

L'ÉTUDE DE LA PEROXYDASE

PAR

E. DE STŒCKLIN

GENÈVE
IMPRIMERIE ROMET, 26, BOULEVARD GEORGES FAVON
1907

Smithsonian Institution
DEC 26 1907
199148

QK
898
P47
1907
BOT

UNIVERSITE DE GENÈVE — INSTITUT DE BOTANIQUE
Prof. Dr R. CHODAT. — 7me Série. — VIIme Fascicule.

CONTRIBUTION

A

L'ÉTUDE DE LA PEROXYDASE

PAR

E. DE STŒCKLIN

GENÈVE
IMPRIMERIE ROMET, 26, BOULEVARD GEORGES FAVON
—
1907

81.193.41
S97

Je désire témoigner à cette place toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont soutenu et aidé au cours de mes études.

Je remercie tout d'abord mes chers maîtres, MM. les professeurs R. Chodat et L. Duparc, du précieux appui que j'ai trouvé chez eux jusqu'à ce jour. Dans les mêmes sentiments, je tiens à assurer Mademoiselle Marie Bovagne et ma tante, Mademoiselle Georgine Claraz, de ma parfaite gratitude.

Fribourg, juin 1907.

CONTRIBUTION

A

L'ÉTUDE DE LA PEROXYDASE[1]

PAR

E. DE STŒCKLIN

Le nom de Peroxydase a été pour la première fois proposé par Linossier[2] pour une action de ferment déjà connue de Schœnbein et même avant lui. Linossier définit les peroxydases comme étant des « corps dont la fonction est de décomposer l'H_2O_2 ou d'autres peroxydes analogues et de provoquer ainsi des oxydations, » tandis que les oxydases seraient des « corps capables de fixer sur un corps oxydable l'oxygène de l'air ». Ces définitions sont déjà toutes dans les travaux de Schœnbein. Comme ce dernier, Linossier confond encore les deux actions, celle d'activer l'oxygène des peroxydes et celle de les décomposer en mettant l'oxygène moléculaire en liberté. C'était d'ailleurs une idée généralement répandue que tous les

[1] Cette étude a été faite sous la direction de M. le professeur R. Chodat dans le Laboratoire de Chimie végétale de l'Institut botanique de l'Université de Genève.

[2] Linossier, *Compt. rend. Soc. biolog.*, V, 373 (1898).

ferments possèdent cette propriété de décomposer l'eau oxygenée en mettant en liberté l'oxygène inerte. Ce n'est que depuis que Lœw eut démontré que le pouvoir de décomposer l'eau oxygénée appartient à un ferment spécial, la catalase, que les enzymologues ont définitivement renoncé à ces propriétés générales des ferments. Mais déjà avant lui Jacobson avait remarqué que la diastase (amylase + dextrinase) peut perdre son pouvoir de décomposer l'eau oxygenée tout en conservant celui de saccharifier l'amidon.

Mais ce n'est qu'à partir du moment où Bach et Chodat [1] apprirent à préparer une peroxydase purifiée et à en étudier les propriétés qu'on peut considérer ce ferment comme définitivement connu car Lœw, même, admet encore [2] que les peroxydases possèdent par elles-mêmes une action oxydante. Bourquelot, également, confondait au début catalase et peroxydase (voir Soc. biol. 1898, 392). Avant ces auteurs Aso [3] et Woods [4] ont fourni d'excellentes contributions à l'étude de la peroxydase. Ce dernier a essayéde montrer la relation qui unit la peroxydase et la maladie connue sous le nom de mosaïque du tabac. Chodat a aussi montré que dans les plantes panachées les régions dépourvues de chlorophylle sont plus riches en peroxydase.

Hunger a étudié la peroxydase de la noix de Coco ; il reconnaît que plusieurs peroxydes (alcool vieilli p. ex.) peuvent servir à ces oxydations.

[1] Ueber Peroxydase, *Ber. d. d. chem. Ges.*, XXXVI, 601-605 (1903).

[2] Lœw, *Berichte. d. d. chem. Ges.* XXV, 2487 (1902).

Jacobson, Untersuchungen über löstiche Fermente, *Zeitschr. f. phys. Chem.* XVI., 340. 1892.

[3] Aso, *Bull. Coll. Agric.* Tokio, V., 2. 231.

[4] Woods, U. S. Dep. of Agricult. Rep. nº 8, 17.

Ainsi la propriété des peroxydases serait d'agir sur les peroxydes pour effectuer par leur intermédiaire des oxydations dont ces derniers sont incapables à eux seuls (ferments oxydants indirects).

Les oxydases sont au contraire des ferments qui, en activant l'oxygène de l'air, effectuent directement les oxydations (ferments oxydants directs).

Chodat et Bach [1] ont alors développé une théorie générale des oxydases : Selon ces auteurs les oxydases seraient des systèmes (mélanges ou combinaisons) de peroxydase et de peroxydes. Le type d'un de ces systèmes serait l'association active de la peroxydase et de l'eau oxygénée. Lorsque comme dans les oxydases l'oxydation ne nécessite pas l'addition de l'eau oxygénée ou d'un autre peroxyde cela proviendrait selon ces auteurs que le peroxyde est déjà dans l'oxydase. Or comme ce peroxyde est ici de la nature d'un ferment ils l'ont nommé oxygénase c'est-à dire ferment qui active l'oxygène. Se basant sur la théorie des oxydations lentes déjà élucidée par le génial Schœnbein et sur les travaux subséquents de Bach, Engler et ses collaborateurs ils admettent tout d'abord que les ferments oxydants sont des peroxydes ; en ceci ils suivent Schœnbein, Engler et Bach.

Mais la théorie Chodat et Bach est autre : elle consiste à admettre dans les ferments oxydants deux composants : le peroxyde (parfois peroxyde ferment) et l'activateur de ce peroxyde, la peroxydase.

C'est par ce caractère du système double que la théorie Chodat et Bach se distingue de celle des peroxydes (Schœnbein, Engler, Bach, Chodat et Bach dans leurs

[1] Chodat et Bach, *Bull. Herbier Boissier* 1903, p. 76.

premiers travaux). Il n'y a donc pas lieu de confondre comme l'a fait récemment M. Bach [1] la théorie des peroxydes-ferments avec la théorie des peroxydes, Chodat et Bach. D'ailleurs personne d'autre ne s'est mépris sur cette distinction [2].

Comme dans tout autre domaine la terminologie adoptée par les auteurs a fourni matière à discussion.

Bourquelot et Marchandier critiquent les termes de peroxydases et d'oxygénases utilisés par R. Chodat et Bach. Selon eux, dans la création d'un mot appliqué aux ferments doivent intervenir, à la fois, le nom de la substance sur laquelle agit le ferment et la nature de l'action que détermine ce ferment. » « Mais le mot tréhalase désigne le ferment qui agit sur le tréhalose et qui agit sur ce sucre en l'hydrolysant. — Dans ces conditions, et en supposant qu'on ait appliqué les mêmes principes aux ferments oxydants, le mot peroxydase signifierait un ferment agissant sur les peroxydes et agissant en les oxydant, ce qui est absurde puisqu'il les réduit. Quant au mot oxygénase il désignerait un ferment qui agirait sur l'oxygène en l'oxydant ! [3] »

Ceci est interprétation de M. Bourquelot, mais il est loin d'être suivi. Le mot oxydase (Yoshida-Bertrand) est employé pour désigner des ferments qui agissent en oxydant ; par conséquent toute désignation de ferments directs ou indirects doit s'inspirer de la définition donnée au nom générique. Les oxydases oxydent des corps et non des oxydes, ils agissent en utilisant l'oxygène. De même

[1] Bach, *Ber. d. d. chem. Ges.* 1906, 3329 et Chodat, *ibid.*, 1906, 2506.

[2] Voir Oppenheimer, Die Fermente II Auflage; See, Oxydases; Bourquelot. l. c.

[3] Bourquelot et Marchandier, *Journ. Phys. et Chimie,* Juill. 1904.

les peroxydases sont des ferments oxydants mais ils utilisent les peroxydes, les oxygénases effectuent leur oxydation par l'intermède de l'oxygène. La nomenclature de Chodat et Bach est donc conforme à l'usage et à la tradition. Si l'on voulait supprimer les termes proposés il faudrait logiquement éliminer pour les mêmes raisons le vocable oxydase. Comme on le voit l'objection de Bourquelot ne tient pas. D'ailleurs cet auteur ne fait que répéter les théories Bach-Chodat dans son travail sur l'oxydation de la vanilline. C'est la transcription des idées de Chodat et Bach dans lesquelles il n'a fait que changer le terme de peroxydase par celui anæroxydase : Or il sera permis de lui demander si ces anæroxydases sont désignées conformément à sa nomenclature, la désinence « ase » s'appliquant exclusivement à des ferments hydrolysants selon lui, ou s'il accepte l'idée de nommer ainsi des ferments oxydants où est la désignation de la substance qui est oxydée.

M. Bourquelot montre par ce travail [1] que la nomenclature de Chodat et Bach non seulement est conforme à la règle qui doit être appliquée dans la désignation des ferments oxydants mais qu'il n'a pas été possible d'en trouver une qui correspondrait aux règles adoptées pour les ferments hydrolysants.

Ce même auteur reprenant la théorie de Chodat et Bach lui donne l'énoncé suivant : « l'oxydase directe serait donc un mélange d'ozonide et d'anæroxydase ».

Or les ozonides de Schœnbein sont les peroxydes de Engler, de Bach et de Bach et Chodat, quant aux anaé-

[1] Bourquelot et Marchandier, Etude de la réaction provoquée par un ferment oxydant indirect sur la vanilline et la morphine. *Ibid.* et *Soc. biol.* Mai 1904, Ac. Sc. Juin 1904.

roxydases ce sont les peroxydases de ces derniers auteurs. Ceux-ci n'auraient pu désirer une confirmation plus complète de leurs idées.

Cette théorie des systèmes peroxydases-peroxydes est actuellement généralement admise [1] ; même les auteurs qui restent sur la réserve l'admettent comme une hypothèse de travail.

Depuis Bertrand, on sait qu'il existe au moins deux oxydases spécifiques et très probablement un grand nombre de catégories d'oxydases.

La première catégorie est celle dont l'image est le système peroxydase-hydroperoxyde et qui effectue une quantité considérable d'oxydations : phénols et polyphénols : phénol (Chodat et Staub) hydroquinone, résorcine, acide gallique, tannin, guiacol, thymol, etc., des corps amidés, p. phenylène diamine, metatoluidine, etc., acide iodhydrique. — D'une manière générale les corps oxydés par l'oxydase (laccase) des champignons (Lactarius) sont aussi oxydés par le système peroxydase-hydroperoxyde. Ce dernier corps peut être remplacé par des peroxydes substitués.

Comme il est difficile d'admettre que les ferments oxydants soient autre chose que des systèmes peroxydes-peroxydase on peut se demander si la spécificité des ferments oxydants nommés laccase et tyrosinase dépend de la nature particulière du peroxyde ou de la spécificité de la peroxydase. Une observation faite par Chodat lui a permis d'élucider ce point.

Alors qu'on peut par le système peroxydase-hydroper-

[1] Voir Oppenheimer, l. c.; Palladine, *Ber. d. d. bot. Ges.* 1906, 98; Bourquelot, l. c. ; See, Oxydases; Chodat, Les ferments oxydants, *Journ. suisse de Chimie et Pharmacie*, 1905.

oxyde oxyder une foule de corps, ce même système est sans effet sur la tyrosine qui même à la longue n'est point altérée.

C'est cette observation qui l'a amené à cette notion que les oxydases spécifiques diffèrent bien moins par la nature de leurs peroxydes (ou oxygénases) que par la spécificité de leurs peroxydases.

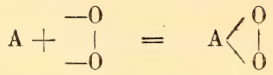
Dans ces considérations sur les ferments oxydants on part donc de cette notion que pendant les procès d'oxydation lentes qui se passent entre des matières en solution ou très divisées et l'oxygène de l'air il y a une phase inévitable, la production parfois passagère d'un peroxyde. Voici résumé selon Bach et Chodat [1] le mécanisme de ce phénomène : « Lorsqu'une substance se combine à l'oxygène moléculaire elle commence par rompre, en vertu de sa propre énergie, par rompre une seule des liaisons qui unissent les atomes dans la molécule d'oxygène et fixe les groupes —O—O—. Il se forme donc toujours comme premiers termes d'oxydation des peroxydes du type du peroxyde d'hydrogène et qui dans la plupart des cas se transforment effectivement en peroxyde d'hydrogène sous l'action de l'eau.

J'emprunte maintenant au lumineux exposé qu'en a fait le professeur Chodat [2] dans le *Journal suisse de Chimie et de Pharmacie* la représentation que voici de la marche du phénomène dans le processus de la formation du peroxyde.

Soit A, un corps qui en vertu de sa propre énergie est capable de se combiner à une molécule d'oxygène O=O.

[1] Chodat et Bach, *Arch. sc. phys. et nat.* Genève 1902.
[2] R. Chodat. *Journ. suisse de Chim. et Pharm.* nº 46. p. 2. 1905.

Selon la théorie de Bach et de Engler A brisera une des liaisons de la molécule d'oxygène, laquelle viendra se fixer sur A comme suit :

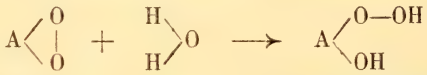


Celle des liaisons qui n'a pas été atteinte, maintient liés entr'eux les deux atomes d'oxygène tandis que la liaison brisée vient se fixer sur le corps oxydable.

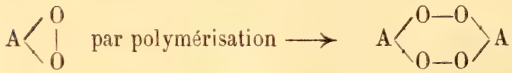
Ce sont des corps de cette nature qui, selon Bach et Engler, sont à la base de toute oxydation lente et peut-être même, ajoutent ces auteurs, les peroxydes sont-ils des termes nécessaires d'une phase de tout phénomène d'oxydation.

Une fois formé, le peroxyde devient agent d'oxydation et peut à son tour oxyder d'autres corps.

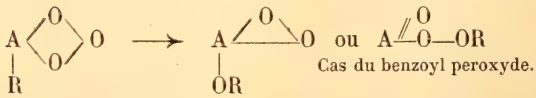
Voici le schéma de quelques types donnés, les uns par Engler, les autres par A. Bach, pour exprimer la formation de corps peroxydés à partir du peroxyde préformé :

I 

Peroxyde. Eau. Peroxyde hydraté (cas de la térébenthine).

II 

Cas de l'acétone peroxydé.

III 

Cas du benzoyl peroxyde.

Dans ces exemples, nous avons le peroxyde s'unissant au corps à oxyder ou à lui-même ; voici d'autres schémas montrant comment par des réactions secondaires les per-

oxydes peuvent en se décomposant donner naissance soit à de l'oxygène atomique ou à de l'ozone et devenir de la sorte actifs — bien qu'indirectement — soit à de l'oxygène moléculaire et rester alors inactifs.

$$AO_2 \longrightarrow AO + O \quad \text{actif}$$
$$2AO_2 \longrightarrow 2AO + O_2 \quad \text{inactif}$$
$$AO_2 \longrightarrow A + O_2 \quad \text{inactif}$$
$$AO_2 + O_2 \longrightarrow AO + O_3 \quad \text{actif}$$
$$AO_4 \longrightarrow AO + O_3 \quad \text{actif}$$

Ces schémas expriment clairement les possibilités présentés par des peroxydes en présence de ferments oxydants indirects c'est-à-dire de peroxydases ou de catalase (dans le cas de la mise en liberté d'oxygène moléculaire).

Dans la théorie de la spécificité défendue par Chodat la peroxydase fonctionnerait comme ambocepteur se combinant d'une part avec le corps oxydable et d'autre part avec le peroxyde.

C'est à cette théorie qu'amènent naturellement les recherches de Bach et Chodat sur le mode d'action de la peroxydase (superoxydase de Chodat). Reprenant une méthode de Bertrand sur l'oxydation du pyrogallol ils ont démontré que dans les conditions de leurs expériences il s'établit entre la peroxydase et l'eau oxygénée un système défini et proportionnel aux variations de l'un des composants. Ceci amène inévitablement à la théorie de l'union de la peroxydase et de l'eau oxygénée selon des proportions définies et confirme indirectement la théorie Chodat et Bach des oxydases, systèmes peroxydes-peroxydases.

Les peroxydases extraites par Chodat et Bach sont des ferments assez stables. Fraichement préparées elles

résistent à l'ébulition si elle n'est que passagère. L'apparence de ces peroxydases est celle d'une poudre blanche demi-cristalline. On pourait se demander si en opérant sur de grandes quantités on arriverait à purifier de plus en plus la peroxydase de manière à élucider les points contestés de sa nature chimique et voir si avec des degrés divers de purification ce ferment présenterait les mêmes propriétés.

En effet la nature chimique des ferments est toujours un problème non résolu. Pour les uns tous les ferments sont des matières albumineuses, pour d'autres il y aurait des ferments qui ne seraient point des albumines (pepsine).

Enfin la théorie de M. Bertrand, selon laquelle les ferments oxydants du type laccase (c'est-à-dire ceux qui ont dans le système peroxydase-peroxyde leur image) agiraient par l'intermède du manganèse qui, sous forme de combinaisons, agirait comme sensibilisateur, comme complément.

Comme toutes les actions connues de la laccase sont aussi effectuées par le système peroxydase-peroxyde, il devenait intéressant de voir si ce système agit aussi par l'intermédiaire de sels de manganèse.

Enfin au cours de ses recherches M. Chodat avait remarqué l'influence toxique de l'eau oxygénée. Il devenait nécessaire de définir l'action de la peroxydase purifiée en fonction de la concentration de l'eau oxygénée.

On verra plus loin que le manganèse n'est pas nécessaire à la manifestation de l'activité du ferment et que la théorie des oxydases sensibilisées par le manganèse devient très improbable.

D'autre part on verra combien la peroxydase est sen-

sible a l'action de l'eau oxygénée et quelles réserves il faut faire à une théorie des peroxydases agissant en proportions définie.

Ce sont là les raisons qui ont engagé mon maître le Prof. Chodat à me proposer d'élucider sous sa direction les points qui vont être décrits.

Préparation de la peroxydase.

La peroxydase est l'un des ferments les plus répandus; on pourrait essayer de l'extraire de beaucoup d'organismes. Mais l'expérience a montré (Chodat et Bach) que le raifort *(Cochlearia Armoracia)* se prête particulièrement bien à cette extraction.

Voici la méthode donnée par Chodat et Bach : on broie la pulpe que l'on obtient en faisant passer la racine dans une machine à hacher, qu'on laisse séjourner pendant 20 heures pour permettre au glycoside, le myronate de potassium, d'être dédoublé par la myrosine.

On fait ensuite macérer le tout dans de l'alcool à 80° qui extrait les essences et d'autres corps accessoires. Le liquide alcoolique coloré en rouge est décanté.

On recommence une seconde fois la même opération et l'on exprime cette fois-ci l'alcool par la presse. Le résidu est traité dans un percolateur par de l'alcool à 40° pendant 40-60 heures. Par cette extraction ou enlève une bonne partie de la peroxydase soluble dans l'alcool à 40°. On peut concentrer cette solution à la température ordinaire dans le vide. On filtre et on précipite par de l'alcool fort (absolu si possible ou à 30°) aussi longtemps que se fait encore un précipité. Ce dernier est recueilli, il est

dissous dans l'eau et reprécipité par l'alcool. On obtient une poudre cristalline blanche et très active.

Nous avons répété cette extraction et obtenu les résultats suivants : 4 k° de raifort broyés, laissés à l'air 20 h., 4 h. alcool à 90° 20 h., puis décanté et répété l'extraction.

Le résidu traité par 7 Lit. alcool à 40° pendant cinq jours, puis précipitation du liquide par 12 Lit. d'alcool à 96°. Le précipité recueilli sur une assiette poreuse se redissout dans l'eau; on le reprécipite et on le sèche sur terre poreuse à l'étuve à 35°. On obtient ainsi 4 grammes d'une poudre blanche assez active.

Le rendement est donc à peu près 10 °/oo, et emploie 5 Lit. d'alcool par k° de raifort.

Dans le but d'éviter une dépense exagérée d'alcool nous avons procédé comme suit :

On laisse sécher la poudre de raifort broyée à une douce chaleur. Quand le raifort est bien sec on le moût dans un moulin qui le réduit en poudre fine. La poudre est couverte d'alcool à 90°, et le traitement subséquent reste le même.

Dans cette seconde extraction nous obtenions à partir de 7 k° 300 de raifort, et de 17 litres d'alcool à 96°, environ 35 gr. de peroxydase.

Pour éviter autant que possible une action prolongée de l'alcool nous avons ensuite essayé un procédé d'extraction à l'eau.

10 k° de raifort traité comme précédemment furent mis en contact avec deux litres d'eau pendant deux jours, puis l'on additionne d'alcool de manière à amener le titre du liquide à 40° d'alcool. Au bout de 9 jours on exprime le liquide et on précipite par l'alcool fort. Nous avons

employé pour cette opération 10 l. d'alcool à 96°. Cette opération fournit 130 gr. d'une poudre très active ce qui correspond à un rendement de 13 °/oo.

On peut aussi précipiter le liquide aqueux par le sulfate d'ammonium en excès, mais ce procédé ne fut pas trouvé pratique.

Nous nous sommes arrêtés alors au procédés suivant :

La pulpe broyée est exposée à l'air pendant quelques heures en remplaçant l'eau qui s'évapore par de l'eau nouvelle puis on exprime le raifort à la presse. Les gâteaux sont de nouveau mis en contact avec l'eau pendant 10-20 heures en remuant de temps à autre. Le liquide doit à peine dépasser la pulpe. Cette opération se répète une seconde fois. Ces trois liquides réunis on commence la précipitation. Il faut que cette dernière se fasse lentement. On s'arrête au premier trouble. Les matières qui se déposent tout d'abord sont peu actives.

Après dépôt, on décante, et on précipite par l'alcool fort. Il se forme un précipité flocconeux et blanc qui se dépose lentement au fond du récipient et sur les parois du vase où il forme une couche gommeuse et adhérente qui jaunit peu à peu. On l'enlève à la spatule aussi vite que possible. On dépose cette masse gommeuse sur des assiettes de porcelaine vernie auxquelles ne s'attache pas le ferment comme il le fait avec la porcelaine dégourdie. Il faut sécher rapidement si possible dans le vide après avoir fait égoutter l'alcool. Le précipite sec est broyé et conservé à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Pour augmenter la valeur enzymatique de ce précipité on peut le purifier d'après la méthode Chodat et Bach en le redissolvant et en reprécipitant, à plusieurs reprises. Il faut avoir soin chaque fois d'éliminer par

filtration le premier trouble produit par l'addition de l'alcool fort.

Nous avons cependant remarqué que les premières fractions précipitées sont moins actives que celles qui sont séparées plus tard. On séparera donc ces deux fractions.

La valeur de chacune des peroxydases obtenues est déterminée en quantité de purpurogalline obtenue. C'est ainsi que nous avons réussi à enrichir la peroxydase jusqu'à lui faire donner quatre fois l'action des meilleures peroxydases obtenues par Chodat et Bach.

Les meilleures peroxydases obtenues par Chodat et Bach étaient des poudres cristallines très blanches et qui entrent facilement en solution dans l'eau. C'est probablement à cette poudre cristalline que M. Rosenfeld a donné le nom peroxydase cristalisée [1].

M. Rosenfeld A. D. a publié un mémoire sur l'oxydase extraite à partir du *Raphanus sativus* et l'action des Alcaloïdes sur cette oxydase.

Cet auteur, qui donne un bon résumé des travaux antérieurs et en particulier de ceux de Chodat et Bach, attribue à la peroxydase extraite d'après les procédés de ces auteurs à la fois une action de peroxydase et une action d'oxydase. Il note en effet que pour peu qu'on lui laisse le temps l'oxydase du Raphanus (peroxydase) oxyde sans eau oxygénée plusieurs des réactifs les plus sensibles.

Il cite en particulier le pyrogallol, la benzidine, la paraphénylènediamine, etc. Nous pensons que l'auteur n'a pas tenu compte d'une cause d'erreur qui a plus d'une fois déjà égaré les enzymologues. Nous voulons parler de la

[1] Rosenfeld. *Die Oxydase von Rad. Raphani sativi L. und über die Wirkung von Alcaloidsalzen auf die Oxydationsthätigkeit* (Pharmac. Instit. Kais milit. med. AK. St-Petersburg, 1906).

facilité avec laquelle beaucoup des réactifs utilisés pour déceler les oxydases se peroxydent à l'air.

L'alcool même doit être vérifié quand on fait seulement des recherches qualitatives. Il est en effet souvent peroxydé ; la résine de gaïac et les autres réactifs se peroxydent rapidement par addition d'une molécule d'oxygène.

Or dès que dans ces réactifs il y a une minime partie qui est peroxydée elle sert de peroxyde pour la constitution d'un système analogue à la laccase : peroxyde-peroxydase. C'est ainsi qu'on peut expliquer cette contradiction que la peroxydase puisse fonctionner aussi comme oxydase.

M. Rosenfeld pense que la peroxydase de Raphanus à laquelle il est arrivé est un corps cristallin ; il arrive également à cette conclusion que la nature ferment est liée à cette structure cristalline. A ces conclusions nous ferons les objections suivantes : L'auteur qui n'est parti de 2 k° de Raphanus n'a obtenu que 0,2 gr. de peroxydase brute. Il a purifiée cette dernière en précipitant d'abord les phosphates calciques par l'ammoniaque et puis par précipitations répétées par l'alcool.

Enfin de compte il a obtenu un restant de 0,02 sur lequel il a pu instituer quelques expériences. La quantité de cendres qui était de 62-70 $^0/_0$ dans sa peroxydase brute a sans doute diminuée, mais cette diminution n'est pas indiquée. Examinée au microscope cette peroxydase cristallisée montre un polymorphisme cristallographique assez grand. L'auteur laisse supposer qu'il peut s'agir d'un mélange mais il tient cependant à cette idée que la fonction ferment est liée à la nature cristalline. Nous pensons que les minimes quantités obtenues par cet auteur ne permettant pas une purification méthodique on ne saurait

inférer de cette coincidence de cristaux et de fonction ferment à la nature cristalline du corps ferment.

Parti de quantités beaucoup plus grandes, il nous a été impossible de pousser la purification plus loin que celle dont il a été fait mention. Mais alors sels et ferment sont précipités en même temps. Nous tenons la démonstration de M. Rosenfeld comme insuffisante.

Notre peroxydase purifiée n'a plus cette apparence cristalline. C'est en majeure partie une substance amorphe, qu'il n'est plus possible de dissocier utilement par une précipitation fractionnée par l'alcool. Ainsi tandis que la poudre blanc grisâtre qui est quatre fois moins active se laisse facilement enrichir, la masse amorphe semble se maintenir également active.

Peroxydase cristalline.	*Peroxydase amorphe.*
Avec l'alcool : précipité tout d'abord inactif	Id., précipité actif.
Avec HNO_3 faible précipité, jaunit un peu (xanthoprotéine).	Id., pas de précipité, jaunit légèrement.
Faible réaction du Biuret.	Pas de réaction de Biuret.
Rougit au réactif de Millon.	Vague coloration qui disparaît aussitôt.
Réaction au chlorure d'or.	Pas de réaction.
Faible précipité par le ferro-cyanure de potassum.	Pas de réaction.
Réaction de Fehling.	Aucune action réductrice.

On voit ainsi que la peroxydase peut être séparée des gommes qui forment une part importante de la peroxydase brute. Les sucres réducteurs font aussi défaut et aucun des réactifs n'a pu permettre de décéler nettement des corps protéïques dans le ferment purifié et très actif. On peut donc affirmer que la peroxydase n'est pas une albumine. C'est à ce résultat qu'étaient également arrivés Chodat

et Bach[1] en utilisant une peroxydase beaucoup moins active.

Rosenfeld ne trouve non plus de réaction de corps protéïques dans sa peroxydase purifiée du Raifort (React. : Millon, Biuret etc. négatives). Il reconnaît cependant la présence de l'azote par la réaction de Lassaigne.

Nous avons fait l'analyse qualitative et quantitative des deux catégories de peroxydases.

		Peroxydase brute.	Peroxydase purifiée
En solution.	NO_3H.....	—	—
	NO_2H.....	—	
	$C_2H_4O_2$.....	Léger précipité.	Trouble à peine sensible.
	$C_6H_6H_2$....	Réduction marquée.	Réaction nulle.
		Cendres.	
	SiO_2.....	Résidu sensible.	—
	PO_4H_3.....	Précipité volumineux.	Précipité abondant.
	SO_4H_2.....	Léger précipité.	Léger précipité.
	Hg.....	Traces.	—
	Sn.....	»	—
	Fe.....	Traces marquées.	—
	Al.....	Léger précipité.	—
	Mn.....	—	—
	Zn.....	Traces.	—
	Ca.....	Précipité abondant.	Précipité abondant.
	Mg.....	» »	» »
	Na.....	» »	» »
	K.....	» »	» »

On voit par ces analyses que les matières minérales qui accompagnent les peroxydases sont surtout des phosphates de calcium, de Mg. de Na et Ka.

[1] A. Bach et R. Chodat, Ueber Peroxydase, Ber. d. d. chem. Ger., XXXVI, 1903, 603.

Analyse quantitative.

	Peroxydase purifiée.	Peroxydase blanche.	Peroxydase brute.
Eau	11.41	9.82	8.65
Matières organiques	65.88	65.95	77.49
Cendres	22.71	24.23	13.83
	100.00	100.00	100.00
Azote	3.43	6.70	5.23
Calculé en protéine	21.46	46.50	32.69

Dosage des cendres.

P_2O_5	0.96	3.47	3.48
Cao	0.42	2.34	5.16
MgO	0.36	1.04	0.76
$K_2O + Na_2O$	76.88	40.80	38.02

Ces analyses montrent que par purification les gommes s'éliminent. On voit aussi que la diminution en teneur d'azote ne correspond pas à une diminution d'activité. Les sels des métaux alcalino-terreux sont également éliminés en grande partie dès les premières purifications.

La proportion notable d'azote est un fait significatif. De plus il faut retenir que la substance organique azotée est soluble dans l'alcool à 40°. Mais l'absence nette des réactions des matières protéïques n'est pas sans causer quelqu'embarras.

Conclusion la peroxydase très active, la plus active contient 65 % de matières organiques, 3 % d'azote et dans ses cendres (22,7 %) surtout des sels alcalins. Si l'on ne peut affirmer que ce ferment est une albumine on ne peut cependant nier qu'il ne soit accompagné de substances organiques azotées.

Parmi les corps organiques qui accompagnent la peroxydase Bach et Chodat en ont cité qui fournissent de l'ammoniaque, la pyridine, Tschirch, le Pyrrol.

M. Rosenfeld a reconnu également que le caractère peroxydase se maintient malgré l'élimination des phosphates calciques; il reconnaît surtout la présence de métaux alcalins liés au phosphore, et au soufre. Mais comme il n'a pas mesuré la force de son ferment purifié on ne peut extraire de ses données si l'élimination des matières salines a diminué ou augmenté l'activité du ferment. Les réactions qualitatives sont incertaines.

Un autre résultat intéressant c'est l'absence absolue de manganèse[1]. On connaît la séduisante théorie de M. Bertrand selon laquelle l'activité de la laccase, le ferment oxydant du *Rhus vernicifera* et des Champignons, et que Chodat et Bach considèrent comme un système peroxydase-peroxyde où le peroxyde est un corps ferment auquel il donnent le nom de oxygénase. — Cette activité serait fonction des sels organiques complexes de manganèse. La laccase privée de manganèse deviendrait inactive.

Les travaux de Chodat et Bach sur la peroxydase ont montré que toutes les oxydations que peut effectuer la laccase, le système peroxydase-peroxyde peut également l'effectuer, il y a identité d'action spécifique.

Il devient donc excessivement intéressant de constater que ni l'oxydase du Lactarius purifiée étudiée par Chodat, ni notre peroxydase purifiée ne contiennent de manganèse. Il se peut que dans les variétés d'oxydases étudiée par M. Bertrand le manganèse joue un rôle important.

[1] Bach et Chodat avaient, dans la peroxydase brute trouvé de 0,2-0,6 de Manganèse. Ils constatent cette présence sans y ajouter d'importance au point de vue de l'action ferment.

Dans nos oxydations ce corps ne joue aucun rôle puisqu'il n'est pas présent[1]. Il faut donc penser que si dans quelques oxydations le manganèse joue le rôle qui lui est attribué par Bertrand il n'est cependant pas nécessaire, et que le système hydroperoxyde-peroxydase peut effectuer son travail maximum sans son intervention.

Son importance dans les phénomènes provoqués par les ferments oxydants devient donc très problématique et en tous cas elle est nulle en ce qui concerne la peroxydase étudiée par nous.

Nous avons voulu aussi examiner dans quelle mesure l'adjonction de certains sels ou des acides aurait une influence sur l'activité de notre peroxydase. A cet effet nous avons établi deux séries d'essais sur les bases suivantes :

1° série. Chaque flacon Erlenmeyer contenait 10 cm^3 H_2O_2 à 1 % et 10 cm^3 de solution de peroxydase fraiche et d'activité moyenne + 1 gramme de pyrogallol. Eau ad 85 cm^3.

2° série. Chaque flacon contenait 10 cm^3 H_2O_2 à 1 %, 10 cm^3 d'une solution de peroxydase un peu vieillie et moins active que la précédente, et 0,5 gr. de pyrogallol. Eau ad 85 cm^3.

Nous avons alors préparé des solutions à 5 % de différents sels. Dans chaque essai de la première série nous avons introduit 5 cm^3 d'une des solutions, variant la nature du sel à chaque essai ; nous avons agi de même dans la deuxième série en n'ajoutant alors que 1 cm^3 de la solution, ce qui fait que les sels se trouvaient dans les essais de la première série à une concentration de 0,3 % et dans la seconde à celle de 0,06 %.

[1] Rosenfeld ne trouve, non plus que nous ni Fer ni Manganèse.

Nature des sels.	I Purpurogalline formée.	II Purpurogalline formée.
O	0.110	0 080
SO_4Na_2	0.110	0.080
SO_4K_2	0.107	0.084
SO_4Mg	0.106	0.083
SO_4Ca	0.109	0.086
SO_4Sr	0.107	0.080
SO_4Fe	0	0.033
NO_3Na	0.115	0.080
NO_3K	0.105	0.081
$(NO_3)_2Ca$	0.105	0.084
PO_4HNa_2	0.066	0.080
PO_4HK_2	0.106	0.088
PO_4HMg	0.110	0.083
PO_4HCa	0.108	0.084

Nous avons ensuite établi deux séries d'expériences analogues aux précédentes mais en utilisant une peroxydase peu active et en remplaçant les sels par les acides en solution $^1/_{10}$ normale.

Nature des acides.	I. Sér. 5 cm³ $^1/_{10}$ n.	II. Sér. 1cc. $^1/_{10}$ n.
O	0.027	0.030
HCl	0.023	0.026
NO_3H	0.023	0.030
SO_4H_2	0.024	0.026
PO_4H_3	0.023	0.026
CH_3COOH,	0.023	0.025
COOH.COOH	0.024	0.030

Ces expériences montrent que ni les sels ni les acides employés n'ont d'action sur le phénomène d'oxydation, exception soit faite pour le sulfate ferreux [1] et le phosphate acide de potassium.

On ne peut donc conclure que les sels ou les acides

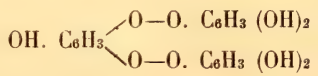
[1] Le sulfate ferreux étant lui même un réducteur énergique empêche la réaction.

auraient une action accélératrice sur le phénomène d'oxydation. Cependant il ne serait pas permis de dire que la peroxydase ne nécessite pas de la présence des sels pour effectuer les phénomènes d'oxydation, car il faudrait pour cela pouvoir les éliminer complètement et examiner leur seuil d'action qui est peut être situé très bas, des traces de sels ou d'acide suffisant à ces réactions.

Nous faisons remarquer que notre peroxydase purifié est très sensible à l'action de la température; une faible ébullition la détruit et son action ne réapparaît pas comme cela arrive selon Woods avec une peroxydase impure (v. Mosaïc disease U. S. Dep. of. Agr. Rep. N° 8, 17). Il semble donc qu'à tous les points de vue la purification a augmenté la sensibilité.

Pour mesurer la valeur des peroxydases aux divers degrés de purification, nous nous sommes servis de la méthode de Chodat et Bach. En d'autres termes nous avons préparé une solution de pyrogallol à laquelle on ajoute une quantité constante d'eau oxygénée puis des quantités variables de ferment. On cherche à connaître la quantité maximum de purpurogalline[1] que peut fournir le système peroxydase hydroperoxyde.

La purpurogalline dont la formule définitive est encore à vérifier a sans doute une composition voisine d'une pyrogalloquinone.



C'est un corps insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool

[1] Nous n'avons pas fait assez d'expériences sur l'activité du système peroxydase-hydroperoxyde sur la catalyse de l'acide iodhydrique pour pouvoir les indiquer ici (voir Bach et Chod. Berichte 1904, et Bach l. c. 2434).

froid et plus encore à chaud ; elle cristallise magnifiquement dans ce liquide. Elle est insoluble dans l'éther. La purpurogalline en aiguilles pourpres fond en se décomposant vers 220-230°. Avec l'acide sulfurique concentrée elle donne une belle solution rouge écarlate et avec l'ammoniaque un liquide bleu qui passe peu à peu au vert et au jaune brun ombre. Perkins a obtenu un dérivé tétrabromé de la formule $C_{20}H_{12}Br_4O_7$ (v. Perkins et Steven. P. Chem. Soc. 249, 1904).

Dans les expériences de Chodat et Bach on avait les chiffres suivants :

I

Nos	Pyrogallol	H_2O_2 à 1 o/o	Peroxydase	Purpurogalline
1	1 gr.	10 cm³	0.01	0.021
2	»	»	0.02	0.042
3	»	»	0.03	0.066
4	»	»	0.04	0.083
5	»	»	0.05	0.102
6	»	»	0.06	0.123
7	»	»	0.07	0.145
8	»	»	0.08	0.166
9	»	»	0.09	0.161
10	»	»	0.10	0.162

Ici le pyrogallol et l'eau oxygénée restent constants, la peroxydase varie :

II

Nos	Pyrogallol	H_2O_2 à 1 %	Peroxydase	Purpurogalline
1	1 gr.	1 cm³	0.10	0.0205
2	»	2 »	»	0.042
3	»	3 »	»	0.060
4	»	4 »	»	0.078
5	»	5 »	»	0.099
6	»	6 »	»	0.121
7	»	7 »	»	0.141
8	»	8 »	»	0.168
9	»	9 »	»	0.168
10	»	10 »	»	0.163

Dans ces expériences on voit que la quantité de peroxydase et la quantité d'eau oxygenée variant la purpurogalline formée est proportionnelle au système peroxydase-peroxyde employé. Ici accidentellement le rapport de la peroxydase est le suivant : 1 cm³ d'eau oxygénée à 1 % est exactement activé par 0,01 gr. de peroxydase. Mais on remarque que dans cette série le maximum d'action est atteint lorsque 0,08 gr. de peroxydase activent 8 cm³ d'eau oxygenée à 1 %. Toute nouvelle addition d'eau oxygenée est sans effet, de même un excès de peroxydase n'augmente pas la quantité de purpurogalline. Dans ces conditions 1 gr. de pyrogallol semblait ne pouvoir fournir que 0,166 de purpurogalline, quelle que soit la quantité du système peroxydase-hydroperoxyde employé. Mais ces auteurs ont aussi fait varier la masse du pyrogallol :

Série III

Nos	Pyrogallol	H_2O_2 à 1 %	Peroxydase	Purpurogalline
1	»	10 cm³	0.10 gr.	0.166
2	»	»	»	0.202
3	»	»	»	0.203
4	»	»	»	0.205

De ces observations Chodat et Bach en ont tiré la conclusion que les oxydations sont dues à l'établissement d'un système chimique dans lequel l'eau oxygénée et la peroxydase s'uniraient passagèrement à la façon d'une combinaison chimique. Ce système serait analogue à l'oxydase des plantes dont on avait soupçonné précédemment la nature peroxyde (Schœnbein, Bach, Engler, Kastle et Lœwenhart).

Pour Chodat et Bach, et c'est là la notion nouvelle importante introduite par leurs travaux, les oxydases

seraient des systèmes peroxydases-peroxydes analogues à celui qu'ils ont réussi à établir dans leurs expériences citées plus haut.

Il y a entre cette théorie et celle des autres auteurs cette différence essentielle que pour Schœnbein, pour Engler et Wild, Bach, Kastle et Lœwenhart, les oxydases sont des peroxydes. Or cette notion était tout à fait insuffisante car s'il est vrai que le peroxyde d'hydrogène puisse à lui seul catalyser l'acide iodhydrique en mettant l'iode en liberté et en brûlant l'hydrogène :

$$_2IH + H_2O_2 = I_2 + H_2O + H_2O$$

il est incapable d'effectuer à lui seul les actions des oxydases : ainsi il ne bleuit pas le gaiac, il ne donne pas la réaction du gaiacol, il n'oxyde pas le pyrogallol en purpurogalline. Il ne suffit donc pas de dire que les oxydases sont des peroxydes comme l'ont fait Engler et Wild, Bach et Kastle et Lœwenhart. Dès lors il est difficile de comprendre que dans un article de polémique[1] M. Bach réclame pour ses travaux antérieurs à la collaboration avec Chodat le mérite d'avoir établi la théorie actuelle des oxydases, systèmes peroxydases-peroxydes.

Cette notion ne date que des recherches de Chodat et Bach qui l'ont établie et défendue dans une série de travaux. C'est là la théorie Chodat et Bach qui diffère comme on le voit essentiellement de celle de Bach qui ne faisait pas intervenir une peroxydase. C'est donc conforme aux faits que de parler d'une théorie des peroxydes Chodat et Bach différente de celle de Engler, Bach, etc.

Les recherches qui vont suivre s'inspirent donc de

[1] A. Bach, *Ber. d. d. chem. Ges.* 1906, 3330.

cette théorie Chodat et Bach et sont destinées à les compléter en élucidant des points restés douteux et à les amender en faisant connaître des résultats nouveaux.

On voit que dans le troisième tableau pour donner toute sa mesure, la peroxydase de ces auteurs, dans le rapport de 0,10 gr. à 10 cm^3 H_2O_2 à 1 % doit agir sur une quantité de pyrogallol dépassant 1 gr. Cette action maximum est mesurée par 0,201 de purpurogalline.

Ces auteurs ne paraissent pas s'être explicitement exprimés au sujet de ce pouvoir d'oxydation en ce qui concerne le pyrogallol. Il ressort seulement de leur travail qu'en variant la concentration du pyrogallol on peut pousser l'action plus loin.

Ayant préparé une peroxydase purifiée (v. p. 19) nous avons vérifié les recherches de ces auteurs et nos résultats nous ont montré que l'incapacité de produire une plus grande quantité de purpurogalline ne peut être attribuée qu'à la nature du système peroxydase hydroperoxyde utilisé par ces auteurs.

Lorsqu'on effectue l'oxydation du pyrogallol par le système peroxydase-peroxyde il se fait à côté de la purpurogalline des produits d'oxydations secondaires, solubles dans l'eau qu'ils colorent en rouge brun. La purpurogalline ne peut donc à elle seule donner toute la mesure de l'activité du ferment ; elle n'exprime qu'une partie de son action.

Lorsqu'on utilise des peroxydases très affaiblies, on voit se faire la coloration sans dépôt de purpurogalline.

Or comme dans nos expériences à partir d'un gramme de pyrogallol nous pouvions obtenir jusqu'à 0,406 de purpurogalline et à partir de quantités moindres de ferment 0,95, il faut admettre que les peroxydases

employées ne sont pas comparables. L'explication la plus plausible est qu'il s'agit de sensibilité différentes vis-à-vis des produits d'oxydation qui ralentissent l'action du ferment. Certaines peroxydases sont plus sensibles, d'autres le sont moins. Cette différence de sensibilité doit provenir de substances accessoires qui dans le premier cas augmentent la toxicité des produits de la réaction sur le ferment et qui manquant dans la peroxydase purifiée lui permettent de pousser plus loin son action.

Mais si la peroxydase dont se sont servis ces auteurs dans leurs expériences paraît sensible à l'action inhibitoire des produits intermédiaires notre peroxydase purifiée qui active une plus grande quantité d'eau oxygénée est par contre très sensible vis-à-vis de cette dernière substance.

Il faut, lorsqu'on expérimente avec ces mélanges, avoir soin de mettre les trois agents, ferment, pyrogallol et eau oxygénée en présence simultanément ayant dissout au préalable isolément les corps dans l'eau de manière à obtenir du coup la concentration cherchée.

A peine les trois corps sont ils en présence que la réaction se produit ; elle se manifeste d'abord par un brunissement du liquide, puis la liqueur s'éclaircit, rougit et l'on voit distinctement apparaître des cristaux colorés, suivant les cas, de teintes variant du jaune rouge au brun sombre et qui se déposent lentement. Après dépôt (10 h.) on recueille le précipité sur des filtres pesés ; on lave après avoir filtré tout le premier liquide avec 100 cm^3 d'eau distillée. On porte finalement le filtre à 105°, en ayant soin de n'atteindre cette température que lentement de façon à éviter un entraînement de la purpurogalline par les vapeur d'eau et l'on pèse.

Nous avons fait un très grand nombre d'expériences qui toutes confirment cette sensibilité de la peroxydase vis-à-vis de l'eau oxygénée (plusieurs centaines). Il en résulte que la loi d'action ne donne pas nécessairement l'image simplifiée que fournissait la première série d'expériences instituée par les auteurs de la théorie du système peroxydase-hydroperoxyde.

Les expériences de ces auteurs montraient déjà le peu de toxicité du pyrogallol vis-à-vis de la peroxydase (v. *Ber. d. d. chem. Ges.* XXXVI, 607 et seq.). Nous avons voulu vérifier ce point en ce qui concerne la peroxydase purifiée.

Pyrogallol	H_2O_2 à 0.85 %	Concentration de l'H_2O_2	Peroxydase	Purpurogalline
0.5	5	0.084	0.1	0.112
1.0	10	0.085	0.1	0.132
1.5	15	0.088	0.1	0.121
2.0	20	0.085	0.1	0.121
2.5	25	0.088	0.1	0.115

On voit que dans ces expériences si l'on a soin de maintenir constante la concentration le résultat reste sensiblement le même.

Dès qu'on fait varier au contraire la concentration de l'eau oxygénée, on voit qu'à mesure qu'elle augmente, l'activité qui tout d'abord progressait se ralentit puis tend vers un minimum.

Pyrogallol	H_2O_2 1 %	Concentration	Peroxydase	Purpurogalline
1	10	0.068 %	0.1	0.232
1	10	0.080 »	0.1	0.169
1	10	0.096 »	0.1	0.138
1	10	0.120 »	0.1	0.127
1	10	0.160 »	0.1	0.104
1	10	0.240 »	0.1	0.054

Dans les premières expériences de Chodat et Bach cette

action nocive ne se montrait pas ou du moins si le plateau qui se manifeste lorsque, dans leurs expériences, on a atteint 0,8 d'eau oxygénée semble indiquer un équilibre atteint, il est difficile de l'attribuer à l'action nocive de l'eau oxygénée. Bach et Chodat à la suite de Schœnhein ont déjà insisté sur la toxicité de l'eau oxygénée lorsque cette dernière est concentrée, mais il se sont bornés à mentionner cette propriété. (Ueber Peroxydase l. c.). En effet dans l'expérience que relatent ces auteurs où l'eau oxygénée est maintenue constante (10 cm^3) la quantité de purpurogalline obtenue à partir de 0,02 de peroxydase est la même que celle qu'on obtenait à partir de 0,10 de peroxydase associée à 10 cm^3 d'eau oxygénée à 1 %.

Cependant depuis lors Chodat a préparé une peroxydase d'action moyenne qui est également sensible vis-à-vis d'un excès d'eau oxygénée. Il nous autorisé à publier cette expérience :

Nos	Peroxydase	Eau oxygénée	Purpurogalline	Calc.
1	0.05	1 cm^3	0.0178	0.016
2	0.05	2 »	0.0321	0.032
3	0.05	3 »	0.0466	0.048
4	0.05	4 »	0.0601	0.064
5	0.05	5 »	0.0802	0.080
6	0.05	6 »	0.0934	0.096
7	0.05	7 »	0.1181	0.112
8	0.05	8 »	0.0956	0.112
9	0.05	9 »	0.0877	0.112
10	0.05	10 »	0.072	0.112
11	0.05	11 »	0.0467	0.112
12	0.05	12 »	0.0453	0.112
13	0.05	13 »	0.0442	0.112
14	0.05	14 »	0.0396	0.112
15	0.05	16 »	0.0358	0.112
16	0.05	15 »	0.0339	0.112
17	0.05	17 »	0.0341	0.112

Ce qui, ramené à 0,10 gr. de peroxydase, fournirait 0,24 de purpurogalline.

Nous avons vu plus haut que lorsqu'on maintient le titre de l'eau oxygénée et du pyrogallol la quantité de purpurogalline se maintient constante.

Voici encore une expérience dans laquelle la concentration du pyrogallol va diminuant tandis qu'on maintient celle de l'eau oxygénée :

Nos	H_2O_2	Concentration	Peroxydase	Purpurogalline
1	10 cm³	0.160 %	0.1	0.100
1	15 »	0.160 »	0.1	0.104
1	20 »	0.160 »	0.1	0.096
1	25 »	0.160 »	0.1	0.102
1	30 »	0.160 »	0.1	0.103

En diminuant la concentration on obtient des résultats meilleurs en ce qui concerne la quantité de purpurogalline :

Nos	H_2O_2 1 %	Concentration	Peroxydase	Purpurogalline
1	15 cm³	0.082 %	0.1	0.249
1	15 »	0.063 »	0.1	0.238
1	15 »	0.055 »	0.1	0.222
1	15 »	0.050 »	0.1	0.220
1	15 »	0.042 »	0.1	0.187

Il semblerait donc qu'il y a une relation entre la concentration de l'eau oxygénée et la quantité de purpurogalline qui peut être fourni par le système peroxydase-peroxyde. Comme l'indiquent les valeurs obtenues dans l'expérience citée plus haut, cela ne peut provenir que d'une action inhibitoire produite par l'eau oxygénée à un certain moment.

L'ensemble de nos études nous a montré que la concentration favorable est voisine de 0,07 %; elle est en tous cas située entre 0,068-0,082 %.

Voici maintenant une série de tableaux desquels on peut déduire les principes que nous venons d'exposer.

I. Tableau donnant la puissance d'oxydation en fonction de l'eau oxygénée.

Pyrogallol	H_2O_2 à 1.35 %	Peroxydase	Purpurogalline	Calculé p. 10 cm³
0.5	1 cm³	0.01	0.032	0.235
0.5	1 cm³	0.005	0.034	0.240
1.0	5 cm³	0.05	0.167	0.248

II. Tableau donnant la puissance d'oxydation en fonction de la peroxydase.

Pyrogallol	H_2O_2	Concentrat.	Peroxydase	Purpurogalline	Calc. p. 0.1 de peroxydase
0.5	10	0.077 %	0.017	0.152	0.880
2.0	60	0.065 »	0.100	0.830	0.830
1.0	2	0.076 »	0.005	0.044	0.880
1.0	35	0.079 »	0.050	0.455	0.910
0.5	4	0.079 »	0.010	0.092	0.920
0.5	10.8	0.073 »	0.017	0.154	0.930

Il resulte de ces tableaux que l'action de la peroxydase peut s'exprimer par les rapports suivants.

III. Tableau

Pyrogallol	H_2O_2 à 1 %	Peroxydase	Purpurogalline	
2.04	37.6	0.2	0.930	chiffres arrondis.
2.00	40	0.2	0.99	
1.00	20	0.1	0.5	

En resumé notre peroxydase activait le double de son poids d'eau oxygénée et oxydait environ 10 fois son poids de pyrogallol pour fournir cinq fois son poids de purpurogalline.

Ainsi qu'il a été dit précédemment notre peroxydase est très sensible à un excès d'eau oxygénée c'est-à-dire à une forte concentration.

Voici le relevé de quelques expériences :

IV. Tableau

Pyrogallol	H_2O_2 à 1 %	Liq. total	Peroxydase	Purpurogalline
1 gr.	1	35 cm³	0.005	0.030
1 »	2	35 »	0.005	0.044
1 »	3	35 »	0.005	0.027
1 »	4	35 »	0.005	0.020

V. Tableau

0.5	10	60 cm³	0.01	0.039
0.5	10	60 »	0.02	0.112
0.5	10	60 »	0.03	0.116

VI. Tableau

1	1.8	30 cm.	0.017	0.033
1	3.6	30 »	0.017	0.066
1	5.4	30 »	0.017	0.076
1	7.2	30 »	0.017	0.048

VII. Tableau

1	1.8	90	0.017	0.030
1	3.6	90	0.017	0.060
1	5.4	90	0.017	0.090
1	7.2	90	0.017	0.120
1	9	90	0.017	0.140
1	10.8	90	0.017	0.129

VIII. Tableau

Pyrogallol	H_2O_2			
1	5	30	0.05	0.1058
1	10	30	0.05	0.1535
1	15	30	0.05	0.1340

IX. Tableau

1	5	40	0.05	0.1000
1	10	40	0.05	0.200
1	15	40	0.05	0.140

X. Tableau

1	5	100	0.05	0.100
1	10	100	0.05	0.200
1	15	100	0.05	0.2700

Ces expériences nous montrent la toxicité du peroxyde de l'hydrogène vis-à-vis du ferment.

XI. Tableau

Pyrogallol	H_2O_2	Liquide	Peroxydase	Purpurogalline
1	15	200	0.05	0.250
1	20	250	0.05	0.180
1	25	300	0.05	0.170

On voit ici qu'en maintenant la quantité de ferment constante et en augmentant la quantité d'eau oxygénée, il y a même, avec une dilution correspondante, regression. Il y a dans un optimum de concentration à définir pour chaque peroxydase.

Pyrogallol	H_2O_2	Concentr.	Vol	Peroxydase	Purpurogalline
1	25	0 071	377	0.05	0.353
1	30	0.075	428	0.05	0.405
1	35	0.079	474	0.05	0.455
1	35	0.071	528	0.05	0.396

Pyrogallol	H_2O_2	Concentr.	Liq. total	Peroxydase	Purpurogalline
1	5	0.055	97	0.05	0.097
1	10	0.059	190	0.05	0.164
1	15	0.063	255	0.05	0.226
1	20	0.067	320	0.05	0.289
1	26	0.071	377	0.05	0.353

L'augmentation est ici proportionnelle à l'augmentation de la concentration soit 0.067-0.063.

Pyrogallol	H_2O_2	Concentr.	Liq. total	Peroxydase	Purpurogalline
1	1.8	0 0618	30	0.017	0.033
1	3.6	0.0618	60	0.017	0.066
1	5.4	0.0618	90	0.017	0.091
1	7.2	0.0618	120	0.017	0.121
1	9	0.0618	150	0.017	0.147
1	10.8	0.0618	180	0.017	0.180

Dans notre expérience nous retrouvons la proportionalité découverte par Bach et Chodat, mais avec notre peroxydase purifiée nous n'obtenons ces résultats qu'à la condition de diluer proportionellement l'eau oxygénée.

SMITHSONIAN INSTITUTION LIBRARIES
3 9088 00624 7068